

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro

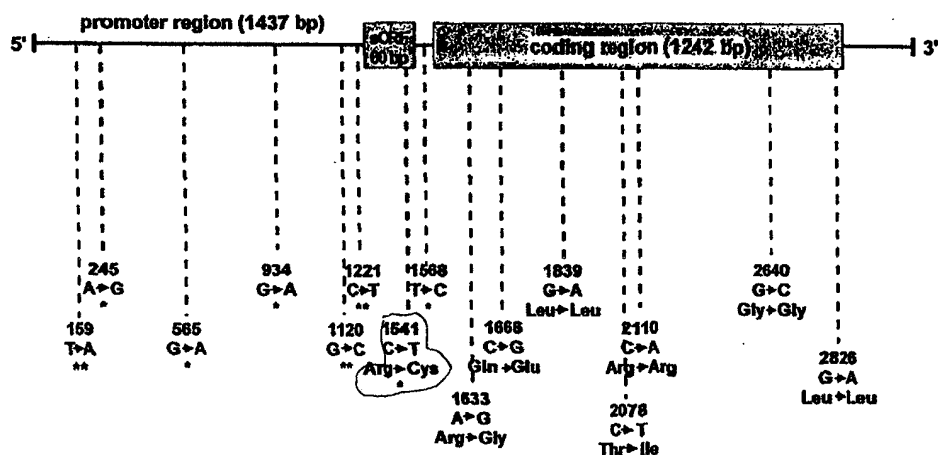


INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : C12N 15/12, C12Q 1/68, C07K 14/705		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/37761 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 29. Juli 1999 (29.07.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE98/03818 (22) Internationales Anmeldedatum: 30. Dezember 1998 (30.12.98) (30) Prioritätsdaten: 197 58 401.2 30. Dezember 1997 (30.12.97) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MAX-DELBÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKULARE MEDIZIN [DE/DE]; Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HOEHE, Margret [DE/DE]; Bartningallee 7, D-10557 Berlin (DE). TIMMERMANN, Bernd [DE/DE]; Schreinerstrasse 59, D-10247 Berlin (DE). KÖPKE, Karla [DE/DE]; Franz-Schmidt-Strasse 19, D-13125 Berlin (DE). (74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; BioTez Berlin-Buch GmbH, Patentstelle, Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).			(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

**(54) Title:** NOVEL SEQUENCE VARIANTS OF THE HUMAN BETA2-ADRENERGIC RECEPTOR GENE AND USE THEREOF

**(54) Bezeichnung:** NEUE SEQUENZVARIANTEN DES MENSCHLICHEN BETA2-ADRENERGEN REZEPTORGENS UND IHRE VERWENDUNG



**(57) Abstract**

The invention relates to novel sequence variants of the human beta2-adrenergic receptor gene and to their use for diagnosing a range of diseases, especially for detecting a predisposition to high blood pressure, for diagnosing reactivity to therapeutic agents where this varies from one case to the next, and for developing therapeutic agents on the basis of pharmacogenetic principles.

### (57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft neue Sequenzvarianten des menschlichen beta2-adrenergen Rezeptorgens und ihre Verwendung zur Diagnose eines Spektrums von Erkrankungen, insbesondere zur Feststellung von Bluthochdruck-Dispositionen, zur Diagnose einer individuell unterschiedlichen Ansprechbarkeit auf Therapeutika und zur Therapeutika-Entwicklung auf der Basis pharmakogenetischer Prinzipien.

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

## **Neue Sequenzvarianten des menschlichen beta2-adrenergen Rezeptorgens und ihre Verwendung**

Die Erfindung betrifft neue Sequenzvarianten des menschlichen beta2-adrenergen Rezeptorgens und ihre Verwendung zur Diagnose eines Spektrums von Erkrankungen, insbesondere zur Feststellung von Bluthochdruck-Dispositionen und zur Therapeutika-Entwicklung auf der Basis pharmakogenetischer Prinzipien.

Der menschliche beta2-adrenerge Rezeptor ist eine wichtige Komponente des sympathischen Nervensystems und reguliert als solche ein Spektrum zentraler und peripherer Funktionen, wie z.B. Herz-Kreislauf-Funktionen, metabolische Funktionen, zentralnervöse Funktionen und Neurosekretion. Er ist Angriffspunkt von Pharmaka/Therapeutika mit einem breiten Indikationsspektrum, die mit zu den am häufigsten verordneten Medikamenten gehören. Vielfältige Befunde weisen daraufhin, daß dieser Rezeptor eine Rolle in der Pathogenese/Pathophysiologie einer Reihe häufiger Erkrankungen spielen könnte, wie z.B. der Hypertonie und anderen Herz-Kreislauf-Erkrankungen, verschiedenen neuropsychiatrischen Erkrankungen wie z.B. Depression, und metabolischen Erkrankungen wie z.B. Fettsucht (Insel PA (Ed) (1987) Adrenergic receptors in man, Marcel Dekker, New York, Basel).

Die Erfindung hat das Ziel, Varianten, Polymorphismen, Mutationen und resultierende Haplotypen in der DNA-Sequenz des menschlichen beta2-adrenergen Rezeptorgens zu ermitteln und deren Korrelationen mit Krankheitsdispositionen festzustellen. Ausgehend von diesen Korrelationen soll ein Verfahren zur Diagnose dieser Krankheitsdispositionen, zur Prädiktion von Schweregrad, Verlauf und Überlebenszeit, ein System zur Prädiktion der individuellen Ansprechbarkeit auf beta2 aktive Therapeutika, zur Entwicklung individuell spezifischer beta2 Rezeptoragonisten und -antagonisten, und ein System zur Entwicklung einer neuen Klasse von beta2 wirksamen Therapeutika, sowie die Entwicklung von Testsystemen zur Erforschung pathophysiologischer Zusammenhänge und Entwicklung oben genannter Therapeutika, entwickelt werden. Zusammenfassend kann für jeden beta2 Genotyp ein individuell optimales Therapeutikum vorhergesagt oder entwickelt werden. Die Aufgabe wird gemäß den Ansprüchen gelöst, die Unteransprüche sind Vorzugsvarianten.

Es wurde gefunden, daß in der 5'-regulierenden Region der Sequenz des menschlichen beta2-adrenergen Rezeptorgens neben den 3 schon bekannten Mutationen in der kodierenden Region (an den Positionen 1633, 1666 und 2078) weitere Varianten vorhanden sind. Es wurde ferner gefunden, daß diese genetischen Varianten mit der Disposition für verschiedene Krankheiten, z. B. Bluthochdruck, korrelieren.

Gegenstand der Erfindung ist danach die Sequenz des menschlichen beta2-adrenergen Rezeptorgens, die an den Positionen 159, 245, 565, 934, 1120, 1221, 1541, 1568, 1633, 1666, 1839, 2078, 2110, 2640, und 2826 ganz oder teilweise mutiert ist. Es handelt sich insbesondere um eine Sequenz, die ganz oder teilweise die Mutationen T→A (Position 159), A→G (Position 245), G→A (Position 565), G→A (Position 934), G→C (Position 1120), C→T (Position 1221), C→T (Arg→Cys) (Position 1541), T→C (Position 1568), A→G (Arg→Gly) (Position 1633), C→G (Gln→Glu) (Position 1666), G→A (Position 1839), C→T (Thr→Ile) (Position 2078), C→A (Position 2110), G→C (Position 2640), und G→A (Position 2826) enthält (Abbildungen 1, 2a und 2b).

Besonders wichtig sind folgende Sequenzen (Haplotypen):

- Sequenz mit den Mutationen 1541 T, 1633 A und 1666 C,
- Sequenz mit den Mutationen 1541 C, 1633 G und 1666 G,
- Sequenz mit den Mutationen 1541 T, 1633 G und 1666 C,
- Sequenz mit den Mutationen 1541 T, 1568 T, 1633 A und 1666 C,
- Sequenz mit den Mutationen 1541 C, 1568 C, 1633 G und 1666 G sowie die
- Sequenz mit den Mutationen 1541 T, 1568 T, 1633 G und 1666 C.

Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Verfahren zur Bestimmung von Krankheitsdispositionen, wobei alle Sequenzen und Varianten des beta2-adrenergen Rezeptorgens von der Einzelmutation bis zu allen möglichen Kombinationen aller Varianten (einschließlich jeder beliebigen absoluten Anzahl von Varianten, die mit einbezogen werden können) genotypisiert werden können und die entsprechende Aussagen über Krankheitsdispositionen ermöglichen.

Das Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß die DNA eines Probanden isoliert und mindestens an einer der ausgetauschten Positionen genotypisiert und nachfolgend mit der Referenz-DNA-Sequenz verglichen wird. Bevorzugt sind Ausführungsformen, in denen mindestens die Position 1633, mindestens die drei Positionen 1541, 1633 und 1666 bzw. die vier letztgenannten Positionen (1541, 1568, 1633 und 1666) oder an den sieben Positionen 245, 565 934, 11541, 1568, 1633 und 1666 genotypisiert werden.

Das Verfahren kann auch variiert werden, indem mindestens 3 der 4 Positionen 1541, 1568, 1633 und 1666 genotypisiert und nachfolgend mit der Referenz-DNA-Sequenz verglichen wird. Bevorzugt ist hier die Genotypisierung der Positionen 1541, 1633 und 1666.

Die Genotypisierung erfolgt durch Sequenzierung oder durch andere Methoden, die für die Detektion von Punktmutationen geeignet sind. Dazu gehören PCR-gestützte Genotypisierungsverfahren wie z. B. allelspezifische PCR, andere Genotypisierungsverfahren unter Verwendung von Oligonukleotiden (Beispiele wären 'dot blotting', oder 'Oligonucleotide Ligation Assays' (OLA)), Verfahren unter Verwendung von Restriktionsenzymen, und 'Single Nucleotide Polymorphism' (SNP) Analyse mittels 'Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry (MALDI), sowie prinzipiell jedwede zukünftig zur Verfügung stehende Methode zur Variantendetektion einschließlich der Chip-Technologie in all ihren technologischen Ausführungen.

Ausgehend davon ist das erfindungsgemäße Verfahren zur Bestimmung eines breiten Spektrums verschiedenster Krankheitsdispositionen geeignet.

In einer Ausführungsvariante z.B. zur Bestimmung einer Disposition für Bluthochdruck, (bzw. der Vorhersage des Bereichs der individuellen Blutdruckwerte als solche), und anderer kardiovaskulärer Erkrankungen, einschließlich Myokardinfarkt und Schlaganfall, im weitesten Sinne die Entstehung einer terminalen Niereninsuffizienz (mit Dialysebedarf).

Eine weitere bevorzugte Ausführungsvariante gestattet z.B. die Bestimmung einer Disposition für neuropsychiatrischen Erkrankungen wie Depressionen und Angstsyndromen (anxiety disorders), attention deficit disorder (mit Hyperactivity), Eßstörungen, z.B. für Anorexia nervosa und Bulimie, oder durch posttraumatischen Streß ausgelöste Störungen; oder für Krankheiten des autonomen Nervensystem, wie z.B. Bradbury-Eggleston, Sky-Drager und Riley-Day Syndrom sowie selektive noradrenerge und Barorezeptor-Dispositionen, oder Migräne.

Außerdem ist es auch für den Nachweis von Dispositionen für allergische Erkrankungen, insbesondere Asthma und atopische Störungen, geeignet.

Ein weiteres Einsatzgebiet ist die Bestimmung einer Disposition für metabolische Erkrankungen wie Fettsucht (sowie familiäre 'morbid obesity'), einschließlich einer Vorhersage des Gewichtsbereichs als solchen oder einer Disposition für Gewichtsveränderung, schließlich eine Voraussage des Verhältnisses der Körpermaße als solche, wie sie sich z.B. im 'body mass index' (BMI) ausdrücken.

Desweiteren erlaubt das Verfahren auch die Bestimmung des Verlaufs und des Schweregrads von Erkrankungen, sowie die Prädikation der Überlebensdauer nach schweren medizinischen Erkrankungen, z.B. nach Myokardinfarkt, Herzversagen und/oder Schlaganfall.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsvariante gestattet die Bestimmung einer individuell unterschiedlichen Reaktivität des autonomen Nervensystems, im besonderen auf endogenen und exogenen Streß (wie sie z.B. insbesondere durch eine individuell unterschiedliche Disposition zu Blutdruck- und/oder Herzfrequenzveränderungen (-auslenkungen) auf endogenen und exogenen Streß zum Ausdruck kommt), oder durch individuell unterschiedliche Blutdruckveränderungen auf endogen oder exogen induzierte Veränderungen der Salzkonzentration im Blut (individuell unterschiedliche Salzsensitivität oder -resistenz), und im weitesten Sinne auch durch individuell unterschiedliche Salz- und Wasserregulation bzw. -rückresorption in der Niere (damit zusammenhängend Volumenregulation) zum Ausdruck kommt.

Ein weiterer wichtiger Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der beanspruchten Sequenzvarianten a) zur Vorhersage der individuell unterschiedlichen Ansprechbarkeit auf bisher bekannte Therapeutika (beta2 Rezeptorliganden) sowie der individuell unterschiedlichen Ansprechbarkeit auf die endogenen Liganden Adrenalin und Noradrenalin; b) vorzugsweise zur Entwicklung individuell spezifischer beta2-Rezeptoragonisten und -antagonisten; c) insbesondere auch zur Entwicklung einer neuen Klasse von Therapeutika, die auf das beta2 Rezeptorgen gerichtet sind, am 5' regulatorischen Bereich, Promotorbereich, insbesondere z.B. am Leaderpeptid angreifen, und via Regulation der Transkription, der Translation sowie durch Beeinflussung deren Effizienz, vornehmlich durch Regulation der Expression, wirken.

In diesem Zusammenhang ist weiterer Gegenstand der Erfindung die Vorhersage der individuellen Gewöhnung auf Medikamentengabe (Tachyphylaxie), sowie einer unterschiedlichen Disposition für Arzneimittelnebenwirkungen. Insgesamt wird eine Prädiktion individuell optimaler Therapeutika, denen somit unterschiedliche Wirkmechanismen zugrundeliegen, möglich.

Ein weiterer wichtiger Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der beanspruchten Sequenzvarianten zum Aufbau von Genen bzw. Vektoren, insbesondere zur Entwicklung von pharmazeutisch relevanten Substanzen sowie zur Entwicklung eines diagnostischen Kits oder jedweder diagnostischer Verfahren. Solche Kits oder Verfahren können vorteilhaft zur Vorhersage der individuellen Krankheitsdisposition oder der individuellen Ansprechbarkeit auf verschiedene beta2-Therapeutika eingesetzt werden.

Kulturen (Zellen), die die genannten unterschiedlichsten Kombinationen von individuellen  $\beta 2$ -Varianten exprimieren, können somit als Testmodelle für die Entwicklung individuell spezifischer Therapeutika ( $\beta 2$ -Agonisten und -antagonisten, sowie  $\beta 2$ -expressionsregulierende DNA-Therapeutika) dienen. Das entspricht Testmodellen *in vitro*, aber auch *in vivo* Testmodelle sind eingeschlossen (transgene Tiere, die diese individuellen Rezeptorvarianten tragen).

Als individuelle Testmodelle erlauben sie *in vitro* (=ex vivo) eine Vorhersage zum individuellen Funktionszustand des  $\beta 2$ -Rezeptors bzw. der von ihm vermittelten Funktionen.

Der Umfang der beanspruchten Erfindung wird im folgenden ausführlich dargestellt. Zur Erarbeitung der Erfindung wurde die gesamte bekannte DNA-Sequenz des menschlichen  $\beta 2$ -adrenergen Rezeptorgens einschließlich seiner regulierenden und kodierenden Regionen in Patienten und Kontrollen mittels der 'Multiplex PCR Sequenzierung' untersucht, und zunächst eine Reihe von genetischen Varianten identifiziert. In der 5' regulierenden Region wurden zum bestehenden Zeitpunkt acht neue Varianten entdeckt, deren wichtigste der Austausch eines hochkonservierten Arg  $\rightarrow$  Cys im 'Leader Peptide' des Genes (Position 1541) zu sein scheint, das die Translation des Rezeptorgens reguliert (Position -47 relativ zum Translationsstartpunkt), d.h. seine Expression.

Zusammenfassung der neu identifizierten Varianten (Nukleotidposition vor dem Austausch ist in Bezug auf die veröffentlichte  $\beta 2$ -Rezeptorsequenz, (Kobilka B.K et al, Proc.Natl.Acad.Sci USA; 84(1): 46-50 (1987)[Acc. No. J02960]; die Angabe in Klammern hinter dem Austausch bezieht sich auf den Translationsstart):

159 T  $\rightarrow$  A (-1429)

245 A  $\rightarrow$  G (-1343)

565 G  $\rightarrow$  A (-1023)

934 G  $\rightarrow$  A (-654)

1120 G  $\rightarrow$  C (-468)

1221 C  $\rightarrow$  T (-367)

1541 C  $\rightarrow$  T (-47) Arg  $\rightarrow$  Cys Austausch im 'Leader Peptide' des  $\beta 2$ -Rezeptorgens

1568 T  $\rightarrow$  C (-20)

Diese Varianten sind in den Abbildungen 1, 2a und 2b übersichtlich dargestellt.

Korrelationen mit Erkrankungen bzw. klinisch relevanten Phänotypen:

Spezifische Einflüsse der beiden bisher bekannten Mutationen Arg->Gly (an Position +46 relativ zum Translationsstartpunkt, entspricht Position 16 der Aminosäuresequenz) und Gln->Glu (an Position +79 relativ zum Translationsstartpunkt, entspricht Position 27 der Aminosäuresequenz), sowie der neu entdeckten 'Leader Peptide' Mutation Arg->Cys (an Position -47 relativ zum Translationsstartpunkt) auf eine Reihe von klinisch und pathogenetisch relevanten Phänotypen wurden in mehreren Studien nachgewiesen. So wurde eine signifikante Assoziation der Allele an Position 16 der Aminosäuresequenz mit genetischer Prädisposition zur Hypertonie, sowie extremer ausgelegten Blutdruckwerten festgestellt. Im weiteren haben die beschriebenen drei Mutationen einen signifikanten Effekt auf phänotypische Parameter wie Herzfrequenz, Noradrenalin-Konzentrationen, Blutdruckveränderungen auf experimentell induzierten physischen und mentalen Stress, 'coping styles' und Persönlichkeitsdimensionen, sowie Gewicht und Gewichtsveränderung. Im besonderen wurde auch eine Assoziation der 'Leader Peptide'-Mutation mit Hypertonie gezeigt. Im weiteren konnte eine Beziehung zwischen beta2-Agonist-induzierter Vasodilatation und beta2 Rezeptormutationen, vorzugsweise an Position 16 der Aminosäuresequenz, hergestellt werden, sowie eine Beziehung zwischen beta2-Rezeptorexpression an Fibroblastenkulturen genotypisierter Individuen und beta2 Rezeptormutationen, vorzugsweise an Position 16 der Aminosäuresequenz.

Detektion spezifischer Dreierkombinationen der Mutationen an Positionen (relativ zur veröffentlichten beta2-Sequenz, Kobilka et al. 1987) 1541 C -> T ('Leader Peptide' Mutation Arg->Cys), 1633 A -> G (Arg->Gly), und 1666 C -> G (Gln->Glu):

Kombination 1: 1541 T (Cys Allel), 1633 A (Arg Allel), 1666 C (Gln Allel)

Kombination 2: 1541 C (Arg Allel), 1633 G (Gly Allel), 1666 G (Glu Allel)

Kombination 3: 1541 T (Cys Allel), 1633 G (Gly Allel), 1666 C (Gln Allel)

Diese drei spezifischen Kombinationen kommen in 80 - 95% der Bevölkerung vor, sie scheinen evolutionär aus der Gesamtanzahl zu erwartender Kombinationen selektioniert zu sein und stellen verschiedene funktionale Zustände des menschlichen beta2-adrenergen Rezeptors dar, die der Variabilität physiologischer und pathophysiologischer Funktionen zugrundeliegen. Im besonderen sind sie mit einer individuell unterschiedlichen Ansprechbarkeit auf endogene Liganden wie Adrenalin und Noradrenalin verbunden, sowie mit einer unterschiedlichen therapeutischen Ansprechbarkeit auf beta2 Rezeptoragonisten und -antagonisten, was diese 'Kombinationen' zum Ausgangspunkt zur Entwicklung 'individuell maßgeschneiderter Pharmakotherapie' machen kann.



Detektion spezifischer beta2- 'Haplotypen' bestehend aus vier Varianten: an Positionen (relativ zur veröffentlichten beta2-Sequenz, Kobilka et al. 1987) 1541 C → T ('Leader Peptide' Mutation Arg- > Cys), 1568 T- > C; 1633 A - > G (Arg- > Gly), und 1666 C - > G (Gln- > Glu):

Kombination 1: 1541 T (Cys Allel), 1568 T, 1633 A (Arg Allel), 1666 C (Gln Allel)

Kombination 2: 1541 C (Arg Allel), 1568 C, 1633 G (Gly Allel), 1666 G (Glu Allel)

Kombination 3: 1541 T (Cys Allel), 1568 T, 1633 G (Gly Allel), 1666 C (Gln Allel)

Kombination 1 wurde signifikant häufiger bei Individuen beobachtet, die erblich mit Hypertonie belastet waren, und stellt somit einen genetischen Risikofaktor dar.

Detektion spezifischer beta2- 'Haplotypen' bestehend aus sieben Varianten:

Unter rechnerischer Berücksichtigung aller Varianten konnten 'Haplotypen', die aus sieben Varianten (einschließlich der drei genannten Mutationen) bestehen, extrahiert werden; den Berechnungen lag das Ziel zugrunde, 'Haplotypen' aus der Gesamtheit des Genoms zu identifizieren, die hinreichend waren, die Patientengruppe von der Kontrollgruppe zu unterscheiden. Ein spezifischer 'Haplotyp', Kombination 1, läßt sich bei genetischer Belastung mit Hypertonie häufiger beobachten, und dies läßt sich auf andere Phänotypen erweitern.

Kombination 1: 245 G, 565 G, 934 A, 1541 T (Cys Allel), 1568 T, 1633 A (Arg Allel), 1666 C (Gln Allel)

Kombination 2: 245 A, 565 A, 934 G, 1541 C (Arg Allel), 1568 C, 1633 G (Gly Allel), 1666 G (Glu Allel)

Kombination 3: 245 G, 565 G, 934 G, 1541 T (Cys Allel), 1568 T, 1633 G (Gly Allel), 1666 C (Gln Allel)

Diese zuletzt beschriebenen 'Haplotypen' beschreiben schließlich den realen, gesamten individuellen Funktionszustand des Rezeptors. Der Erfindung liegt das Konzept zugrunde, daß es nicht einzelne Mutationen sind, die unterschiedlichen funktionellen (dysfunktionalen) Rezeptorzuständen zugrundeliegen, sondern diese durch die individuelle 'polymorphe' Gesamtgenesequenz als funktionsdeterminierender Einheit bedingt werden.

Die Erfindung wird anschließend durch ein Ausführungsbeispiel näher erläutert.

### Material und Methoden

Für die Erhebung des gesamten polymorphen Spektrums des beta2-Rezeptorgens wurde die Multiplex-PCR-Sequenziermethode verwendet. Hierzu wurde die gesamte bisher bekannte Promoterregion und die kodierende Region in acht Fragmente unterteilt und mittels PCR amplifiziert (siehe Abb. 1). Diese PCR Fragmente wurden gepoolt und simultan sequenziert. Die Fragmente der Terminationsreaktionen wurden auf einem Sequenzgel aufgetrennt und mittels Direkter Transfer Elektrophorese (DTE) auf eine Nylonmembran übertragen. Die Dekodierung der einzelnen Sequenzleitern erfolgte durch sukzessives Hybridisieren mit spezifischen Oligonukleotiden.

Die spezifischen Bedingungen für die Amplifikation waren wie folgt:

Für Fragment I wurde der Vorwärtsprimer ADRBR-F1 mit der Sequenz 5'-TATTGGCCAGGATCTTTTGCTTTCTAT-3' und der Rückwärtsprimer ADRBR-R1 mit der Sequenz 5'-TAACATTAAGAACATTTTGAAGC-3' verwendet. Fragment II wurde mit Hilfe der beiden Primer ADRBR-F2: 5'-GCATACCCCGCTCCAGATAAA-3' und ADRBR-R2: 5'-GCACGCACATACAGGCACAAATAC-3' amplifiziert. Für Fragment III waren es die beiden Primer ADRBR-F3: 5'-GGCCGCGTTTCTGTGTTGG-3' und ADRBR-R3: 5'-AGTGCGTTCTGCCCCGTTATGTG-3'. Für das Fragment VIII die beiden Primer ADRBR-F8: 5'-GGTACTGTGCCTAGCGATAAC-3' und ADRBR-R8: 5'-TAAAATACCCCGTGTGAGCAAATAAGAG-3'. Die Reaktionsbedingungen für diese vier Fragmente waren wie folgt: 10 x PCR Puffer (100 mM Tris-HCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O, 500 mM KCl, pH 8,3), dNTP 2 mM, 30 µM Primer F, 30 µM Primer R, 50 ng genomische DNA und 5 U einer *Taq* DNA Polymerase. Alle drei Fragmente wurden mit folgendem Temperaturprofil amplifiziert: 94 °C 4 min; 35 Zyklen: 94 °C 30 sec, 60 °C 30 sec, 72 °C 1 min und abschließend 72 °C 10 min.

Fragment IV wurde mit Hilfe der beiden Primer ADRBR-F4: 5'-GGGGAGGGAAAGGGGAGGAG-3' und ADRBR-R4: 5'-CTGCCAGGCCCATGACCAGAT-3' amplifiziert. Für Fragment VII wurden die Primer ADRBR-F7: 5'-CTGGCTGCCCTTCTTCATCGTT-3' und ADRBR-R7: 5'-TACCTCAAGTTAAATAGTCTGTT-3' verwendet. Die Bedingungen für diese beiden PCR-Reaktionen waren wie folgt: 10 x PCR Puffer (160 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1 % Tween-20, 500 mM KOH, pH), dNTP 2 mM, 30 µM Primer F, 30 µM Primer R, 50 ng genomische DNA und 4 U eines Gemisches aus der *Taq* DNA Polymerase und einer thermostabilen inorganischen Pyrophosphatase von *Thermus thermophilus*. Beide Fragmente wurden mit folgendem Temperaturprofil amplifiziert: 94 °C 4 min; 35 Zyklen: 94 °C 30 sec, 66 °C [Fragment IV] bzw. 60 °C [Fragment VII] 30 sec, 72 °C 1 min und abschlie-

End 72 °C 10 min.

Fragment V wurde mittels der beiden Primer ADRBR-F5: 5'-ATGCGCCGGACCACGAC-3' und ADRBR-R5: 5'-GTAGAAGGACACGATGGA-3' amplifiziert, Fragment VI mit den beiden Primern ADRBR-F6: 5'-GCTACTTTGCCATTACTTCACC-3' und ADRBR-R6: 5'-AAATCTGGGCTCCGGCAGTAGATAAG-3'. Diese beiden Fragmente wurden mit Hilfe des 'AmpliTaQ Gold Kits' von Perkin Elmer amplifiziert. Das Temperaturprofil bei diesen beiden Fragmenten war wie folgt: 94 °C 10 min; 35 Zyklen: 94 °C 30 sec, 56 °C [Fragment V] bzw. 58 °C [Fragment VI] 30 sec, 72 °C 1 min und abschließend 72 °C 10 min.

Die Sequenzierung erfolgte mit Hilfe des 'Thermo Sequenase cycle sequencing kit' von Amersham. Als Sequenzierprimer wurden die oben beschriebenen PCR Primer verwendet. Die Sequenzierung wurde in vier Multiplex-Pools durchgeführt. Pool 1 enthielt die Sequenzierprimer ADRBR-F1, ADRBR-F3, ADRBR-F5 und ADRBR-F7; Pool 2 die Sequenzierprimer ADRBR-R1, ADRBR-R3, ADRBR-R5 und ADRBR-R7. In beide Sequenzier-Poole wurden die PCR-Fragmente I, III, V und VII eingesetzt. Pool 3 hingegen enthielt die Sequenzierprimer ADRBR-F2, F4, F6 und F8; Pool 4 die Sequenzierprimer ADRBR-R2, R4, R6 und R8. In diese beiden Poole wurden die Fragmente II, IV, VI und VIII eingesetzt.

Sämtliche PCR- und Sequenzierungsreaktionen wurden in einem PTC 225 Cycler von MJ Research durchgeführt.

Die Produkte der Sequenzreaktionen wurden auf einem 100 µm dicken Acrylamidgel (5% Acrylamid, 7 M Harnstoff) aufgetrennt und unter Standard DTE Bedingungen (siehe Richterich and Church, 1993), auf eine Biotodyne A Membran (Pall) übertragen. Die Membran wurde dann mit <sup>32</sup>P- markierten Oligonukleotiden hybridisiert und die einzelnen Sequenzleitern mit Hilfe eines Phospho-Fluorimager (Storm 860, Molecular Dynamics) detektiert.

**Literatur:**

Kobilka B.K., Dixon R.A., Frielle T., Dohlman H.G., Bolanowski M.A., Sigal I.S., Yang Feng T.L., Francke U., Caron M.G., Lefkowitz R.J.: cDNA for the beta 2-adrenergic receptor: a protein with multiple membrane-spanning domains and encoded by a gene whose chromosomal location is shared with that of the receptor for platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA.*; 84 (1): 46-50 (1987).

Parola A.L. and Kobilka B.K. The peptide product of a 5' leader cistron in the beta 2 adrenergic receptor mRNA inhibits receptor synthesis. *J Biol Chem.* 269 (6): 4497-505 (1994).

Richterich P. and Church G.M.: DNA sequencing with direct transfer electrophoresis and nonradioactive detection. *Methods Enzymol.* 218: 187-222 (1993).

**Legenden zu den Abbildungen:****Abbildung 1**

Polymorphes Spektrum des menschlichen beta 2-adrenergen Rezeptorgens  
Varianten sind entsprechend ihrer Nukleotidposition eingezeichnet  
(Referenzsequenz Kobilka et al. 1987).

**Abbildung 2 a**

Sequenz des menschlichen beta 2-adrenergen Rezeptors (Kobilka et al. 1987)  
Varianten sind entsprechend ihrer Position eingezeichnet.

**Abbildung 2 b**

Sequenz des menschlichen beta 2-adrenergen Rezeptors (Kobilka et al. 1997).  
Eingezeichnet sind die Varianten (Nukleotid- bzw. Aminosäureaustausch).

**Patentansprüche**

1. Sequenz des menschlichen beta2-adrenergen Rezeptorgens, dadurch gekennzeichnet, daß die Basen an den Positionen 159, 245, 565, 934, 1120, 1221, 1541, 1568, 1633, 1666, 1839, 2078, 2110, 2640, und 2826 ganz oder teilweise ausgetauscht sind.
2. Sequenz nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie ganz oder teilweise die Basenaustausche T→A (Position 159), A→G (Position 245), G→A (Position 565), G→A (Position 934), G→C (Position 1120), C→T (Position 1221), C→T (Position 1541), T→C (Position 1568), A→G (Position 1633), C→G (Position 1666), G→A (Position 1839), C→T (Position 2078), C→A (Position 2110), G→C (Position 2640), und G→A (Position 2826) enthält.
3. Sequenz nach Anspruch 1 und 2, gekennzeichnet durch die Mutationen 1541 T, 1633 A und 1666 C.
4. Sequenz nach Anspruch 1 und 2, gekennzeichnet durch die Mutationen 1541 C, 1633 G und 1666 G.
5. Sequenz nach Anspruch 1 und 2, gekennzeichnet durch die Mutationen 1541 T, 1633 G und 1666 C.
6. Sequenz nach Anspruch 1 und 2, gekennzeichnet durch die Mutationen 1541 T, 1568 T 1633 A und 1666 C.
7. Sequenz nach Anspruch 1 und 2, gekennzeichnet durch die Mutationen 1541 C, 1568 C 1633 G und 1666 G.
8. Sequenz nach Anspruch 1 und 2, gekennzeichnet durch die Mutationen 1541 T, 1568 T 1633 G und 1666 C.
9. Verfahren zur Bestimmung von Krankheitsdispositionen, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA eines Probanden isoliert und mindestens an einer der ausgetauschten Positionen genotypisiert und nachfolgend mit der Referenz-DNA-Sequenz verglichen wird, wobei ggf. alle möglichen Kombinationen von Varianten von der Einzelmutation bis zu allen möglichen Kombinationen aller Varianten einschließlich jeder beliebigen absoluten Anzahl von Varianten einbezogen werden.

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA eines Probanden isoliert und mindestens an der Position 1633 genotypisiert wird.
11. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA eines Probanden isoliert und mindestens an den 3 Positionen 1541, 1633 und 1666 genotypisiert wird.
12. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA eines Probanden isoliert und mindestens an den 4 Positionen 1541, 1568, 1633 und 1666 genotypisiert wird.
13. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA eines Probanden isoliert und mindestens an den 7 Positionen 245, 565, 934, 1541, 1568, 1633 und 1666 genotypisiert werden.
14. Verfahren nach Anspruch 9 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Positionen 1541, 1568, 1633 und 1666 genotypisiert werden.
15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens 3 der 4 Positionen 1541, 1568, 1633 und 1666 genotypisiert werden.
16. Verfahren zur Bestimmung von Krankheitsdispositionen 9, 11 oder 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Positionen 1541, 1633 und 1666 genotypisiert werden.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Genotypisierung durch Sequenzierung oder durch andere Methoden, die für den Nachweis von Varianten geeignet sind, erfolgt.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 17 zur Bestimmung einer Disposition für Bluthochdruck sowie für Blutdruckabweichungen von der Norm und andere kardiovaskuläre Erkrankungen, einschließlich Myokardinfarkt und Schlaganfall; zur Bestimmung einer Disposition für neuropsychiatrische Erkrankungen wie Depressionen, Angstsyndromen, attention deficit disorder mit Hyperactivity, Eßstörungen, z.B. Anorexia nervosa und Bulimie, oder für durch posttraumatischen Streß ausgelöste Störungen; zur Bestimmung einer Disposition für Krankheiten des autonomen Nervensystem, wie z.B. Bradbury-Eggleston, Sky-Drager und Riley-Day Syndrom sowie selektive noradrenerge und Barorezeptor-Dispositionen, oder Migräne; zur Bestimmung einer Disposition für allergische Erkrankungen, insbesondere Asthma und atopische Störungen; zur Bestimmung einer Disposition für metabolische Erkrankungen wie Fettsucht sowie familiäre 'morbid obesity',

einschließlich einer Vorhersage des Gewichtsbereichs als solchen oder einer Disposition für Gewichtsveränderung, schließlich eine Voraussage des Verhältnisses der Körpermaße als solche, wie sie sich z.B. im 'body mass index' (BMI) ausdrücken.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 17 zur Bestimmung einer individuell unterschiedlichen Reaktivität des autonomen Nervensystems, im besonderen auf endogenen und exogenen Streß.

20. Verfahren nach Anspruch 19 zur Bestimmung einer individuell unterschiedlichen Disposition für Blutdruck- und/oder Herzfrequenzveränderungen/-auslenkungen auf endogenen und exogenen Streß, oder einer individuell unterschiedlichen Salzsensitivität/-resistenz.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 17 zur Bestimmung des Verlaufs und des Schweregrads von Erkrankungen, wie z.B. unter Anspruch 18 aufgeführt, z. B. von neuropsychiatrischen Erkrankungen wie Depressionen und Angstsyndromen, von kardiovaskulären Erkrankungen, einschließlich Myokardinfarkt und Schlaganfall, von Krankheiten des autonomen Nervensystems sowie von allergischen Erkrankungen, wie z.B. Asthma.

22. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 17 zur Bestimmung einer Disposition für metabolische Erkrankungen wie Fettsucht.

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 17 zur Prädikation der Überlebensdauer nach schweren medizinischen Erkrankungen, z.B. nach Myokardinfarkt, Herzversagen und/oder Schlaganfall.

24. Verwendung der Sequenzvarianten nach Anspruch 1 bis 8 zur Entwicklung von Therapeutika und/oder Lifestyle-drugs.

25. Verwendung nach Anspruch 24 zur Entwicklung einer neuen Klasse von Therapeutika, die auf das beta2-Rezeptorgen gerichtet sind, und am 5'-regulatorischen Bereich, im Promotorbereich, sowie am Leaderpeptid angreifen, via Regulation der Transkription und Translation sowie durch Beeinflussung von deren Effizienz, vornehmlich durch Regulation der Expression, wirken.

26. Verwendung nach Anspruch 24 zur Entwicklung von beta2-Rezeptoragonisten und -antagonisten, insbesondere von individuell spezifischen beta2-Rezeptoragonisten und -antagonisten.

27. Verwendung nach einem der Ansprüche 9 bis 17 zur Prädiktion der individuell unterschiedlichen Ansprechbarkeit auf bisher bekannte, wie beta2-Rezeptorliganden, sowie zukünftig, auch unter Anspruch 24 bis 26 entwickelte Therapeutika, und der individuell unterschiedlichen Ansprechbarkeit auf die endogenen Liganden Adrenalin und Noradrenalin.

28. Verwendung nach einem der Ansprüche 9 bis 17 zur Vorhersage der individuellen Gewöhnung auf Medikamentengabe (Tachyphylaxie), sowie einer unterschiedlichen Disposition für Arzneimittelnebenwirkungen.

29. Verwendung nach einem der Ansprüche 9 bis 17 zur Optimierung der individuellen, auf den beta2-Rezeptor und sein Gen gerichteten Therapie bzw. Intervention.

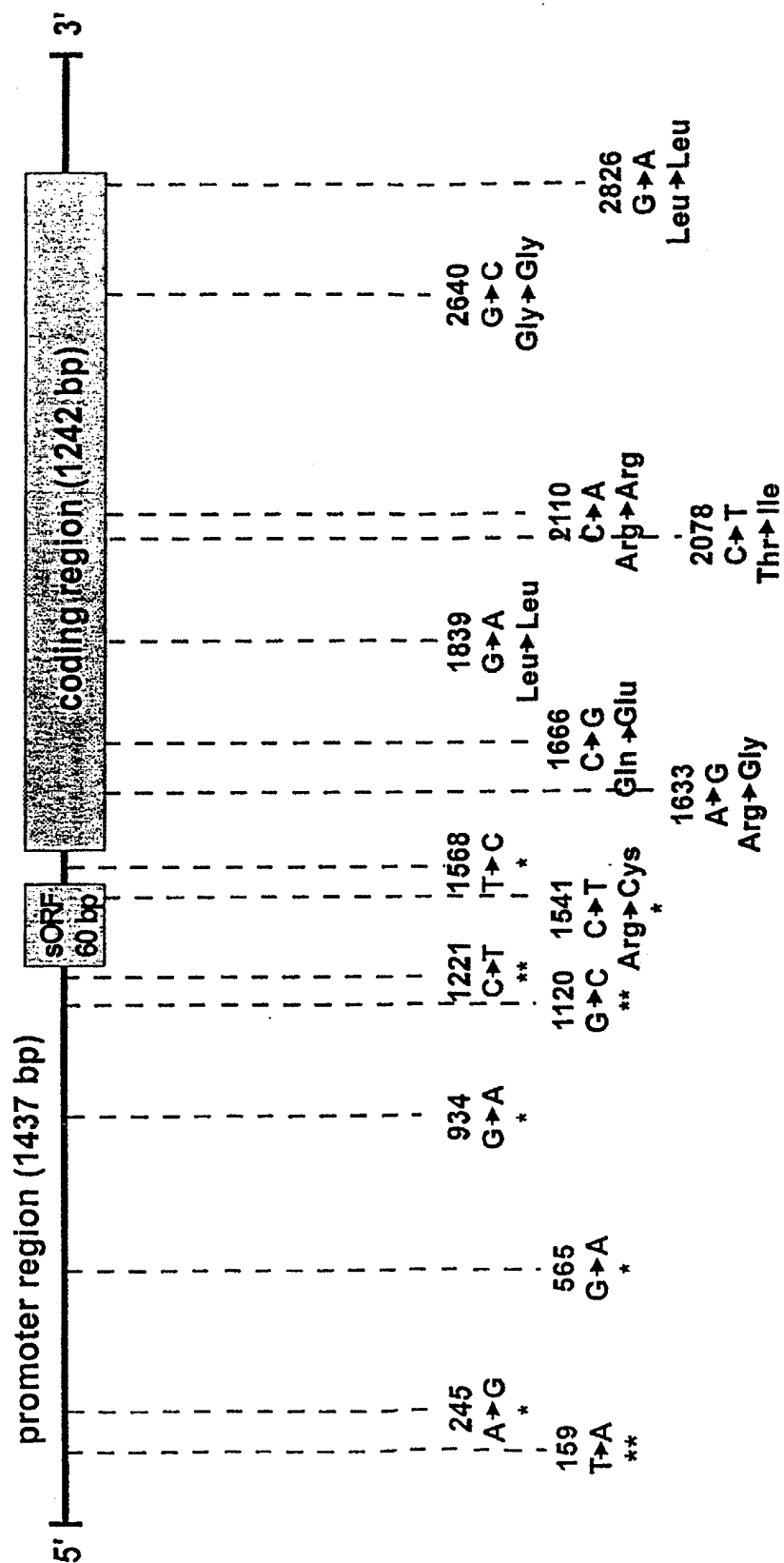
30. Verwendung der Sequenzvarianten nach Anspruch 1 bis 8 zum Aufbau von Genen bzw. Vektoren, insbesondere zur Entwicklung von pharmazeutisch relevanten Substanzen.

31. Verwendung nach Anspruch 24 bis 30 zur Entwicklung eines diagnostischen Kits, oder jedweden Verfahrens zur Genotypisierung.

32. Verwendung nach Anspruch 24 bis 31 zur Entwicklung eines diagnostischen Kits zur Vorhersage der individuellen Ansprechbarkeit auf verschiedene beta2-Rezeptor-agonisten sowie -antagonisten, sowie auf jedwede neu entwickelten beta2 aktiven Therapeutika, im besonderen auch nach Anspruch 25; zur Vorhersage der therapeutischen Wirksamkeit von Pharmaka, deren Wirkmechanismus Veränderungen der beta2-Rezeptorstruktur, -regulation, oder -expression miteinbezieht; zur Vorhersage der individuell unterschiedlichen Ansprechbarkeit auf die endogenen Liganden Adrenalin und Noradrenalin; zur Vorhersage der individuellen Gewöhnung auf Medikamentengabe - Tachyphylaxie -, sowie einer unterschiedlichen Disposition für Arzneimittelnebenwirkungen; zur Optimierung der individuellen, auf den beta2-Rezeptor und sein Gen gerichteten Therapie bzw. Intervention.

33. Verwendung nach Anspruch 1 bis 8 sowie 9 bis 32 zur Entwicklung von in vitro (z.B. Zellkulturen) und in vivo (z.B. transgene Tiere) Testsystemen, die individuelle Formen des beta2-Rezeptorgens exprimieren, wobei die Testsysteme zur Untersuchung der Pathophysiologie von Erkrankungen von generell medizinisch wichtigen Merkmalen mit Beteiligung des beta2-Rezeptorgens dienen, sowie zur Entwicklung und Testung individuell spezifischer Therapeutika und 'lifestyle- drugs' und von beta2-gerichteten Substanzen im allgemeinen.





1 cccgggttca agagattctc ctgtctcagc ctcccagta gctgggacta caggtagctg  
 61 ccaccacacc tggctaattt ttgtattttt agtagagaca agagttacac catattggcc  
 121 aggatctttt gctttctata gcttcaaaat gttcttaa<sup>a</sup>tg ttaagacatt cttaatctc  
 181 tgaaccatat gaatttgcca ttttggttaag tcacagacgc cagatgggtg caatttcaca  
 241 tggc<sup>g</sup>acaacc cgaaagatta acaactatc cagcagatga aaggattttt tttagtttca  
 301 ttgggtttac tgaagaaatt gtttgaattc tcattgcac tccagttcaa cagataatga  
 361 gtgagtgatg ccacactctc aagagttaa aaaaaaaca caaaaaaatt aaaacaaaag  
 421 cacacaactt tctctctctg tcccaaaata catacttgca taccctcgct ccagataaaa  
 481 tccaaagggg aaaactgtct tcatgcctgc aaattcctaa ggagggcacc taaagtactt  
 541 gacagcgagt gtgctgagga aatc<sup>a</sup>ggcagc tgttgaagtc acctctgtg ctcttgccaa  
 601 atgtttgaaa ggaatacac tgggttaccg ggtgtatgtt gggaggggag cattatcagt  
 661 gctcgggtga ggcaagttcg gtagccag atggagacat ccgtgtctgt gtcgtctctg  
 721 atgcctcaa gccagcgtgt gtttactttc tgtgtgtgtc accatgtctt tgtgtctctg  
 781 ggtgcttctg tgtttgtttc tggcgcgtt tctgtgttg acaggggtga ctttgtgccg  
 841 gatggcttct gtgtgagagc gcgcgcgagt gtgcatgtcg gtgagctggg aggggtgtgc  
 901 tcagtgtcta tggctgtggt tgggtataag tct<sup>a</sup>gagcatg tctgccaggg tgtatttctg  
 961 cctgtatgtg cgtgcctcgg tgggcactct cgtttccttc cgaatgtggg gcagtgcgg  
 1021 tgtgtgccc tctgccttga gacctcaagc cgcgcaggcg ccagggcag gcaggtagcg  
 1081 gccacagaag agccaaaagc tccgggttg gctggtaagg<sup>c</sup> acaccacctc cagcttttagc  
 1141 cctctggggc cagccagggt agccgggaag cagtgggtgg ccgccctcca gggagcagtt  
 1201 gggcccgcc cgggccagcc<sup>t</sup> ccaggagaag gagggcgagg ggaggggagg gaaaggggag  
 1261 gagtgcctcg ccccttcgcg gctgccggcg tgccattggc cgaagttcc cgtacgtcac  
 1321 ggcgagggca gttcccctaa agtctgtgc acataacggg cagaacgcac tgcgaagcgg  
 1381 cttcttcaga gcacgggctg gaactggcag gcaccgcgag cccctagcac ccgacaagct  
 1441 gagtgtgcag gacgagtc caccacaccc acaccacagc cgtgaaatga ggcttcacag  
 1501 cgtccgctcg cggcccgag agccccgccc tgggtccgccc<sup>t</sup> cgtgagggc cccccagca  
 1561 gtgcgt<sup>c</sup>ctac ctgccagact gcgcgccatg gggcaaccgg ggaacggcag cgccttcttg  
 1621 ctggcacc<sup>g</sup>ca at<sup>g</sup>gaagcca tgcgccggac cagcagtc<sup>g</sup>ca cgcag<sup>g</sup>aaaag ggacgaggtg  
 1681 tgggtgggtg gcatgggcat cgtcatgtct ctcacgtcc tggccatcgt gtttggaat

1741 gtgctgggtca tcacagccat tgccaagttc gagcgtctgc agacgggtcac caactacttc  
1801 atcacttcac tggcctgtgc tgatctgggc atgggcct<sup>a</sup>gg cagtgggtgcc ctttggggcc  
1861 gcccatattc ttatgaaaat gtggactttt ggcaacttct ggtgcgagtt ttggacttcc  
1921 attgatgtgc tgtgcgtcac ggccagcatt gagaccctgt gcgtgatcgc agtggatcgc  
1981 tactttgcca ttacttcacc tttcaagtac cagagcctgc tgaccaagaa taaggcccgg  
2041 gtgatcattc tgatgggtgtg gattgtgtca ggcctta<sup>t</sup>cct cttctttgcc cattcagatg  
2101 cactgggtac<sup>a</sup>c gggccaccca ccaggaagcc atcaactgct atgccaatga gacctgctgt  
2161 gactttcttca cgaaccaagc ctatgccatt gcctcttcca tegtgtcctt ctacgttccc  
2221 ctgggtgatca tggctcttctg ctactccagg gtcttttcagg agggccaaaag gcagctccag  
2281 aagattgaca aatctgaggg ccgcttccat gtccagaacc ttagccaggt ggagcaggat  
2341 gggcggacgg ggcattggact ccgcagatct tccaagttct gcttgaagga gcacaaagcc  
2401 ctcaagacgt taggcatcat catgggcact ttcaccctct gctgggtgcc cttcttcac  
2461 gttaacattg tgcattgtgat ccaggataac ctcatccgta aggaagttta catcctccta  
2521 aattggatag gctatgtcaa ttctggtttc aatccctta tctactgccg gagcccagat  
2581 ttcaggattg ccttccagga gcttctgtgc ctgcgcaggt cttctttgaa ggcctatgg<sup>c</sup>g  
2641 aatggctact ccagcaacgg caacacaggg gagcagagtg gatatcacgt ggaacaggag  
2701 aaagaaaata aactgctgtg tgaagacctc ccaggcacgg aagactttgt gggccatcaa  
2761 ggtactgtgc cttagcgttaa cattgattca caaggaggga attgtagtac aatgactca  
2821 ctgct<sup>a</sup>gtaaa gcagtttttc tactttttaa gaccccccc ccccaaacag aacactaaac  
2881 agactattta acttgagggg aataaactta gaataaaatt gtaaaaattg tatagagata  
2941 tgcagaagga agggcatcct tctgcctttt ttattttttt aagctgtaaa aagagagaaa  
3001 acttatttga gtgattattt gttatttga cagttcagtt cctctttgca tggaaattgt  
3061 aagtttatgt ctaaagagct ttagtcctag aggacctgag tctgctatat tttcatgact  
3121 tttccatgta tctacctcac tattcaagta ttaggggtaa tatattgctg ctggtaat  
3181 gtatctgaag gagattttcc ttctacacc cttggacttg aggattttga gtatctcgga  
3241 cctttcagct gtgaacatgg actcttcccc cactctctt atttgctcac acgggggtatt  
3301 ttaggcaggg atttgaggag cagcttcagt tgttttcccc agcaaaggtc taaagtttac  
3361 agtaataaaa atgtttgacc atgccttcac tgcacctgtt tgtccaaaac cccttgactg  
3421 gagtgctgtt gcctcccca ctggaaacgg c

Abb. 2a

ERSATZBLATT (REGEL 26)

1 cccgggttca agagattctc ctgtctcagc ctcccgagta gctgggacta caggtaactg  
 61 ccaccacacc tggctaattt ttgtattttt agtagagaca agagttacac catattggcc  
 121 aggatctttt gctttctata gcttcaaat gttctta<sup>a</sup>tg ttaagacatt ctttaacttc  
 181 tgaaccatat gaatttgcca ttttggttaag tcacagacgc cagatgggtg caatttcaca  
 241 tggc<sup>g</sup>acaacc cgaaagatta acaaaactatc cagcagatga aaggattttt tttagtttca  
 301 ttgggttttac tgaagaaatt gtttgaattc tcattgcac tccagttcaa cagataatga  
 361 gtgagtgatg ccacactctc aagagttaaa aacaaaacaa caaaaaaatt aaaacaaaag  
 421 cacacaactt tctctctctg tcccaaaaata cataacttgc tacccecgct ccagataaaa  
 481 tccaaagggg aaaactgtct tcatgcctgc aaattcctaa ggagggcacc taaagtactt  
 541 gacagcgagt gtgctgagga aatc<sup>a</sup>ggcagc tgttgaagtc acctcctgtg ctcttgccaa  
 601 atgtttgaaa ggaatacac tgggttaccg ggtgtatgtt gggaggggag cattatcagt  
 661 gctcgggtga ggcaagtctg gagtaccag atggagacat cgtgtctgt gtcgctctgg  
 721 atgcctccaa gccagcgtgt gtttactttc tgtgtgtgtc accatgtctt tgtgcttctg  
 781 ggtgcttctg tgtttgtttc tggccgcgtt tctgtgttgg acaggggtga ctttgtgccg  
 841 gatggcttct gtgtgagagc gcgcgcgagt gtgcatgtcg gtgagctggg aggggtgtgtc  
 901 tcagtgtcta tggctgtggt tcggtataag tct<sup>a</sup>gagcatg tctgccaggg tgtatttgtg  
 961 cctgtatgtg cgtgcctcgg tgggcactct cgtttccttc cgaatgtggg gcagtgcggg  
 1021 tgtgctgccc tctgccttga gacctcaagc cgcgcaggcg cccagggcag gcaggtagcg  
 1081 gccacagaag agccaaaagc tcccgggttg gctggta<sup>c</sup>agg acaccacctc cagcttttagc  
 1141 cctctggggc cagccagggt agccgggaag cagtgggtgg ccgccctcca gggagcagtt  
 1201 gggccccgcc cgggccagcc <sup>t</sup>caggagaag gagggcgagg ggaggggagg gaaaggggag  
 1261 gagtgcctcg ccccttcgag gctgcgcggc tgccattggc cgaaagtcc cgtacgtcac  
 1321 ggcgagggca gttcccctaa agtcctgtgc acataacggg cagaacgcac tgcgaagcgg  
 1381 cttcttcaga gcacgggctg gaactggcag gcaccgcgag cccctagcac ccgacaagct  
 1441 gagtgtgcag gacgagtcac caccacaccc acaccacagc cgctgaatga ggcttccagg  
 1501 cgtccgctcg cggcccgcag agccccgccg tgggtccgcc <sup>g</sup>(Arg → Cys) cgtgaggcg cccccagcca  
 1561 gtgcgct<sup>c</sup>tac ctgccagact gcgcgccatg gggcaaccgg ggaacggcag cgccttcttg  
 1621 ctggcaccca at<sup>g</sup>gaagcca tgcgcgggac cagcagctca cgcag<sup>g</sup>aaag ggaacgaggtg  
 1681 tgggtggtgg gcatgggcat cgtcatgtct ctcatcgtec tggccatcgt gtttggcaat  
 1741 gtgctggtca tcacagccat tgccaagtgc gagcgtctgc agacggtcac caactacttc

1801 atcacttcac tggcctgtgc tgatctggtc atgggcct<sup>a</sup> cagtggtgcc ctttggggcc  
 1861 gcccatattc ttatgaaaat gtggactttt ggcaacttct ggtgcgagtt ttggacttcc  
 1921 attgatgtgc tgtgcgtcac ggccagcatt gagaccctgt gcgtgatcgc agtggatcgc  
 1981 tacttttgcca ttacttcacc tttcaagtac cagagcctgc tgaccaagaa taaggcccgg  
 2041 gtgatcattc tgatgggtgtg gattgtgtca ggcctta<sup>t</sup> cttctttgcc cattcagatg  
 2101 cactgggtac<sup>a</sup> gggccacca ccaggaagcc atcaactgct atgccaatga gacctgctgt  
 2161 gactttcttca cgaaccaagc ctatgccatt gcctcttcca tegtgtcctt ctacgttccc  
 2221 ctgggtgatca tggctcttct ctactccagg gtctttcagg aggccaaaag gcagctccag  
 2281 aagattgaca aatctgaggg ccgcttccat gtccagaacc ttagccaggt ggagcaggat  
 2341 gggcggacgg ggcattggact ccgcagatct tccaagttct gcttgaagga gcacaaagcc  
 2401 ctcaagacgt taggcatcat catgggcact ttcacctct gctggctgcc cttcttcatc  
 2461 gttaacattg tgcattgtat ccaggataac ctcatccgta aggaagttaa catcctccta  
 2521 aattggatag gctatgtcaa ttctggtttc aatcccccta tctactgccg gagcccagat  
 2581 ttcaggattg ccttccagga gcttctgtgc ctgcccaggt cttctttgaa ggcctatggg<sup>c</sup>  
 2641 aatggctact ccagcaacgg caacacaggg gagcagagtg gatatcacgt ggaacaggag  
 2701 aaagaaaata aactgctgtg tgaagacctc ccaggcacgg aagactttgt gggccatcaa  
 2761 ggtactgtgc ctacgataa cattgattca caaggaggga attgtagtac aaatgactca  
 2821 ctgct<sup>a</sup>gtaaa gcagtttttc tacttttaaa gacccccccc cccccaacag aacactaaac  
 2881 agactattta actgaggggt aataaactta gaataaaatt gtaaaaattg tatagagata  
 2941 tgcagaagga agggcatcct tctgcctttt ttattttttt aagctgtaaa aagagagaaa  
 3001 acttatttga gtgattattt gttatttgta cagttcagtt cctctttgca tggaaattgt  
 3061 aagtttatgt ctaaagagct ttagtcctag aggacctgag tctgctatat ttctatgact  
 3121 ttcccatgta tctacctcac tattcaagta ttaggggtaa tatattgctg ctggtaattt  
 3181 gtatctgaag gagattttcc ttcctacacc cttggacttg aggattttga gtatctcgga  
 3241 ccttttcagct gtgaacatgg actcttcccc cactcctctt atttgctcac acgggggtatt  
 3301 ttaggcaggg atttgaggag cagcttcagt tgttttcccg agcaaaggtc taaagtttac  
 3361 agtaaaataa atgtttgacc atgccttcat tgcacctgtt tgtccaaaac ccttgactg  
 3421 gagtgtgtgt gcctccccc ctggaaaccg c

Abb. 26

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 98/03818

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/12 C12Q1/68 C07K14/705

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K C12N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LIGGETT S.: "Polymorphisms of the beta-2 adrenergic receptor and asthma" AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY AND CRITICAL CARE MEDICINE, vol. 156, no. 4, October 1997, pages S156-S162, XP002106240 siehe insbes. Abb. 1 --- -/-	1,2

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 June 1999

Date of mailing of the international search report

30/06/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Kania, T

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 98/03818

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>TURKI J ET AL: "Myocardial signaling defects and impaired cardiac function of a human beta 2 - adrenergic receptor polymorphism expressed in transgenic mice."</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, (1996 SEP 17) 93 (19) 10483-8. JOURNAL CODE: PV3. ISSN: 0027-8424., XP002106241</p> <p>United States</p> <p>see the whole document</p>	1,2,33
X	<p>TURKI J. ET AL.: "GENETIC POLYMORPHISMS OF THE BETA2-ADRENERGIC RECEPTOR IN NOCTURNAL AND NONNOCTURNAL ASTHMA" JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 95, 1995, pages 1635-1641, XP002106242</p> <p>see the whole document</p>	1,2,9, 10, 17-21, 24,26, 27,29, 31-33
X	<p>LARGE V. ET AL.: "Human beta-2 adrenoceptor gene polymorphisms are highly frequent in obesity and associate with altered adipocyte beta-2 adrenoceptor function"</p> <p>JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 100, no. 12, 1997, pages 3005-3013, XP002106243</p> <p>see the whole document</p>	1,2,9, 17,18, 22,24, 26,31
A	<p>PAROLA A L ET AL: "The peptide product of a 5' leader cistron in the beta 2 adrenergic receptor mRNA inhibits receptor synthesis."</p> <p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, (1994 FEB 11) 269 (6) 4497-505. JOURNAL CODE: HIV. ISSN: 0021-9258., XP002106244</p> <p>United States</p> <p>cited in the application</p> <p>siehe insbes. Abb. 2</p>	1-33
A	<p>KOBILKA B K ET AL: "Functional activity and regulation of human beta 2 - adrenergic receptors expressed in Xenopus oocytes."</p> <p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, (1987 NOV 15) 262 (32) 15796-802. JOURNAL CODE: HIV. ISSN: 0021-9258., XP002106245</p> <p>United States</p> <p>cited in the application</p> <p>see the whole document</p>	1-33
-/--		

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 98/03818

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HALL I.: "Beta-2 adrenoceptor polymorphisms: are they clinically important ?" THORAX, vol. 51, 1996, pages 351-353, XP002106246 see the whole document	1-33
P,X	TIMMERMANN B ET AL: "Novel DNA sequence differences in the beta2 - adrenergic receptor gene promoter region." HUMAN MUTATION, (1998) 11 (4) 343-4. JOURNAL CODE: BRD. ISSN: 1059-7794., XP002106247 United States see abstract	1-8
P,X	TIMMERMANN B. ET AL: ".beta.-2 Adrenoceptor genetic variation is associated with genetic predisposition to essential hypertension: The Bergen Blood Pressure Study" KIDNEY INTERNATIONAL, (1998) 53/6 (1455-1460). REFS: 32 ISSN: 0085-2538 CODEN: KDYIA5, XP002106248 United States see the whole document	1-33
P,X	MCGRAW D W ET AL: "Polymorphisms of the 5' leader cistron of the human beta2 - adrenergic receptor regulate receptor expression." JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, (1998 DEC 1) 102 (11) 1927-32. JOURNAL CODE: HS7. ISSN: 0021-9738., XP002106249 United States see the whole document	1-33
T	SCOTT M G ET AL: "Identification of novel polymorphisms within the promoter region of the human beta2 adrenergic receptor gene." BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY, (1999 FEB) 126 (4) 841-4. JOURNAL CODE: B00. ISSN: 0007-1188., XP002106250 ENGLAND: United Kingdom see the whole document	1-33



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

rationales Aktenzeichen

PCT/DE 98/03818

<b>A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES</b>		
IPK 6 C12N15/12 C12Q1/68 C07K14/705		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
<b>B. RECHERCHIERTE GEBIETE</b>		
Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)		
IPK 6 C07K C12N C12Q		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)		
<b>C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN</b>		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	LIGGETT S.: "Polymorphisms of the beta-2 adrenergic receptor and asthma" AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY AND CRITICAL CARE MEDICINE, Bd. 156, Nr. 4, Oktober 1997, Seiten S156-S162, XP002106240 siehe insbes. Abb. 1  ----- -/-	1,2
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
<p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
17. Juni 1999		30/06/1999
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter  Kania, T

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 98/03818

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>TURKI J ET AL: "Myocardial signaling defects and impaired cardiac function of a human beta 2 - adrenergic receptor polymorphism expressed in transgenic mice."</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, (1996 SEP 17) 93 (19) 10483-8. JOURNAL CODE: PV3. ISSN: 0027-8424., XP002106241</p> <p>United States</p> <p>siehe das ganze Dokument</p>	1,2,33
X	<p>TURKI J. ET AL.: "GENETIC POLYMORPHISMS OF THE BETA2-ADRENERGIC RECEPTOR IN NOCTURNAL AND NONNOCTURNAL ASTHMA"</p> <p>JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, Bd. 95, 1995, Seiten 1635-1641, XP002106242</p> <p>siehe das ganze Dokument</p>	1,2,9, 10, 17-21, 24,26, 27,29, 31-33
X	<p>LARGE V. ET AL.: "Human beta-2 adrenoceptor gene polymorphisms are highly frequent in obesity and associate with altered adipocyte beta-2 adrenoceptor function"</p> <p>JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, Bd. 100, Nr. 12, 1997, Seiten 3005-3013, XP002106243</p> <p>siehe das ganze Dokument</p>	1,2,9, 17,18, 22,24, 26,31
A	<p>PAROLA A L ET AL: "The peptide product of a 5' leader cistron in the beta 2 adrenergic receptor mRNA inhibits receptor synthesis."</p> <p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, (1994 FEB 11) 269 (6) 4497-505. JOURNAL CODE: HIV. ISSN: 0021-9258., XP002106244</p> <p>United States</p> <p>in der Anmeldung erwähnt</p> <p>siehe insbes. Abb. 2</p>	1-33
A	<p>KOBILKA B K ET AL: "Functional activity and regulation of human beta 2 - adrenergic receptors expressed in Xenopus oocytes."</p> <p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, (1987 NOV 15) 262 (32) 15796-802. JOURNAL CODE: HIV. ISSN: 0021-9258., XP002106245</p> <p>United States</p> <p>in der Anmeldung erwähnt</p> <p>siehe das ganze Dokument</p>	1-33

-/--

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

II rationales Aktenzeichen

PCT/DE 98/03818

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	HALL I.: "Beta-2 adrenoceptor polymorphisms: are they clinically important ?" THORAX, Bd. 51, 1996, Seiten 351-353, XP002106246 siehe das ganze Dokument	1-33
P,X	TIMMERMANN B ET AL: "Novel DNA sequence differences in the beta2 - adrenergic receptor gene promoter region." HUMAN MUTATION, (1998) 11 (4) 343-4. JOURNAL CODE: BRD. ISSN: 1059-7794., XP002106247 United States siehe Zusammenfassung	1-8
P,X	TIMMERMANN B. ET AL: ".beta.-2 Adrenoceptor genetic variation is associated with genetic predisposition to essential hypertension: The Bergen Blood Pressure Study" KIDNEY INTERNATIONAL, (1998) 53/6 (1455-1460). REFS: 32 ISSN: 0085-2538 CODEN: KDYIA5, XP002106248 United States siehe das ganze Dokument	1-33
P,X	MCGRAW D W ET AL: "Polymorphisms of the 5' leader cistron of the human beta2 - adrenergic receptor regulate receptor expression." JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, (1998 DEC 1) 102 (11) 1927-32. JOURNAL CODE: HS7. ISSN: 0021-9738., XP002106249 United States siehe das ganze Dokument	1-33
T	SCOTT M G ET AL: "Identification of novel polymorphisms within the promoter region of the human beta2 adrenergic receptor gene." BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY, (1999 FEB) 126 (4) 841-4. JOURNAL CODE: B00. ISSN: 0007-1188., XP002106250 ENGLAND: United Kingdom siehe das ganze Dokument	1-33